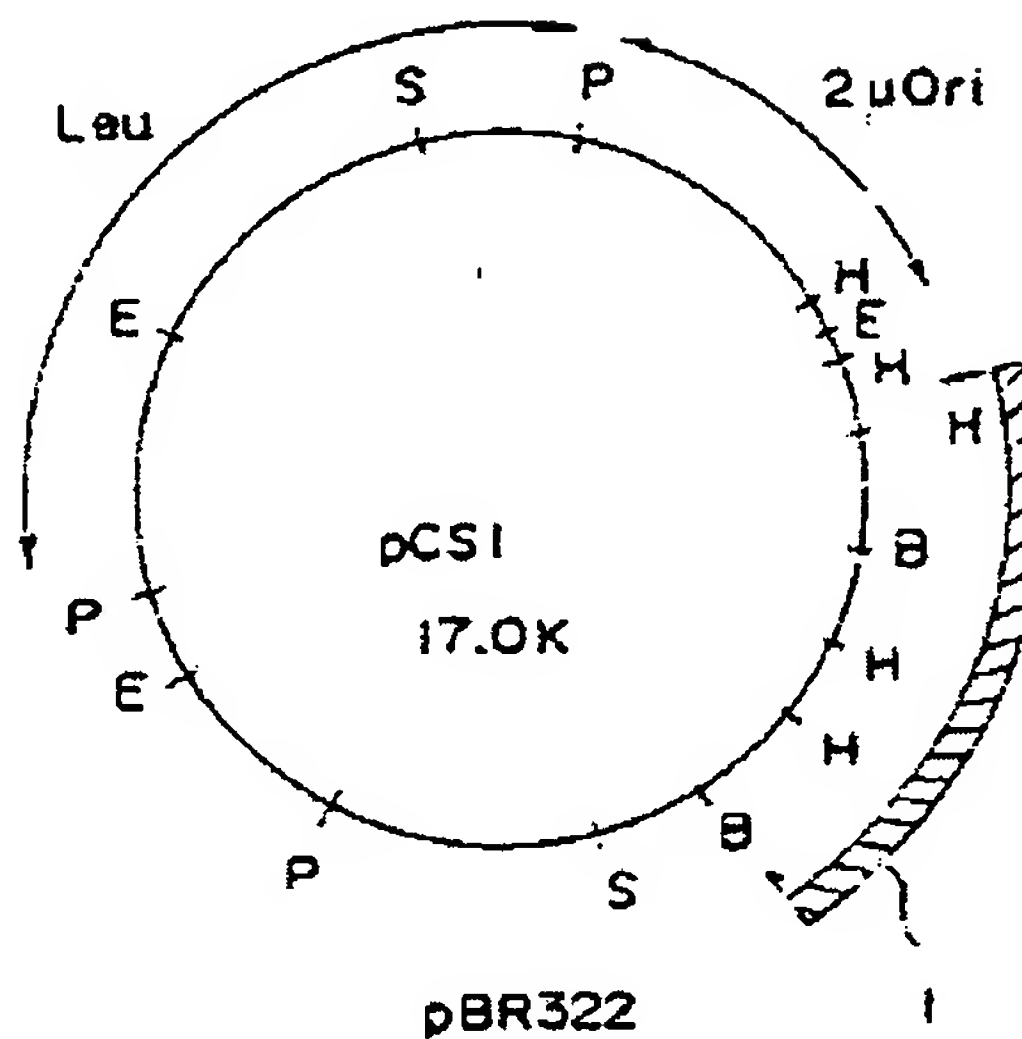


**PLASMID AND PRODUCTION THEREOF****Publication number:** JP62074287**Publication date:** 1987-04-06**Inventor:** TAKAGI MASAMICHI; YANO KEIJI; SHIBUYA ICHIRO;  
MORIKAWA MINORU**Applicant:** NIKKA WHISKY**Classification:****- international:** C12N15/09; C12N15/81; C12R1/19; C12R1/72;  
C12R1/865; C12N15/09; C12N15/81; (IPC1-7):  
C12N15/00; C12R1/19; C12R1/72; C12R1/865**- european:** C12N15/81**Application number:** JP19850212187 19850927**Priority number(s):** JP19850212187 19850927

Report a data error here

**Abstract of JP62074287**

**PURPOSE:**A plasmid, containing an autoreplication sequence of *Candida maltosa*, *Leu2* gene derived from *Saccharomyces cerevisiae* and ampicillin-resistant gene and utilizing *Escherichia coli* and plural species of yeasts as a host. **CONSTITUTION:**A gene library of *Candida maltosa* is prepared by using a vector YEp13 (containing *Leu2* gene) of *Saccharomyces cerevisiae* and transformed by using *Candida maltosa* having requirement for leucine as a host. A plasmid is separated from the resultant transformant to transform *Escherichia coli*. Thereby, an ampicillin-resistant plasmid is then separated to afford the aimed plasmid.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-74287

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 15/00  
//C 12 N 15/00  
C 12 R 1:865  
1:72  
1:19)

識別記号

庁内整理番号

7115-4B

⑭ 公開 昭和62年(1987)4月6日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全4頁)

⑮ 発明の名称 プラスミドとその製造方法

⑯ 特 願 昭60-212187

⑰ 出 願 昭60(1985)9月27日

特許法第30条第1項適用 昭和60年6月10日 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨集」に発表

⑱ 発 明 者	高 木	正 道	東京都府中市栄町1-31-10
⑱ 発 明 者	矢 野	圭 司	東京都北区滝野川1-41-3
⑱ 発 明 者	渋谷	一 郎	柏市東中新宿4-1-2-206
⑱ 発 明 者	森 川	実	柏市東中新宿4-1-2-105
⑲ 出 願 人	ニツカウキスキー株式		東京都港区南青山5丁目4番31号
	会社		
⑳ 代 理 人	弁理士 渡邊	一平	

明 細 書

1. 発明の名称

プラスミドとその製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) キャンディダ マルトーサの自己複製配列とサツカロマイセス セレビジエ由来の Leu 2 遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子を含んで成るプラスミド。
- (2) 下記(a)~(c)の工程を含むことを特徴とするプラスミドの製造方法。
  - (a) サツカロマイセス セレビジエのベクター YE<sub>p</sub>13 (Leu 2 遺伝子を含む)を用いてキャンディダ マルトーサのジーンライブラリーを作製する。
  - (b) 次に、該ジーンライブラリーをロイシン要求性キャンディダ マルトーサを宿主として形質転換する。
  - (c) 得られた形質転換体からプラスミドを分離して大腸菌に形質転換し、アンピシリン耐性のプラスミドを分離する。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は大腸菌及び複数の種類の酵母を宿主とすることができるプラスミド、即ちシャトルベクターとその製造方法に関する。

(従来の技術)

近年、分子生物学及び遺伝子工学の発展を背景に組換えDNAの手法を用いて有用な物質を生み出す方法が脚光を浴びている。有用物質を生産する手段の一つとして、あるいは有用遺伝子を微生物に組込む方法として、プラスミドに目的とする遺伝子を挿入し、宿主菌を形質転換させることが常法である。その際、酵母を形質転換させることの頻度の低さを補うため、プラスミドを大量に分離することを目的として、大腸菌を形質転換させ、同時に酵母をも形質転換させることができるベクター(これは特にシャトルベクターと呼ばれる)が必須である。すでに大腸菌とサツカロマイセス セレビジエ(酵母の一属)間のシャトルベクターについての報告がある(例えばYE<sub>p</sub>13(プロ

ーチ, ジエイ, アール, ストラザーン, ジエイ, エヌ, ヒックス, ジエイ, ビー, ジーン (Broach, J.R., Strathern, J.N., Hicks, J.B., Gene), 8, 121 (1979)) や YRp 7 (ストルール, ケイ, ステンクコム, ディー, ティー, シェーラー, エス, ディビス, アール, ダブリュー, の プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., Davis, R.W., Proc. Natl. Acad. Sci.), 76, 1035 (1979))

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、従来よりもさらに宿主域が広いシヤトルベクターが要望されており、そこで本発明者らは酵母の一種ではあるがサツカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) とは異種のキャンディダ マルトーサ (*Candida maltosa*) からの自己複製配列 (Autonomously Replicating Sequence) (以下、A R S という) に着目し、これを利用して大腸菌とキャンディダ マルトーサ間だけでなく、さらにサツカロマイセス セレ

のプラスミドを分離する。

ここで A R S とは、ある DNA 断片及び自己断片の自律増殖を可能にする DNA 断片を意味する。

本発明のプラスミド、即ちシヤトルベクターに外来有用遺伝子を挿入し、大腸菌を形質転換させて大数のプラスミドを得、これを用いてサツカロマイセス セレビジエ又はキャンディダ マルトーサを宿主菌として有用物質 (例えば、ホルモンや酵素) を生産することが可能となる。尚、外来の有用遺伝子としては動物や植物からだけでなく、前述のサツカロマイセス セレビジエやキャンディダ マルトーサらの酵母菌体並びに大腸菌等バクテリアが持つ遺伝子も含まれる。

本発明の新規なプラスミドは、例えば以下の通り作製される。

サツカロマイセス セレビジエのベクター YEp 13 (Leu 2 を含む) を制限酵素 BamHI にて切断する。その切断位置にキャンディダ マルトーサの全 DNA を制限酵素 Sau3AI で部分切断した断片を挿入し、大腸菌で形質転換させ、アンピシリ

ジエにおいても安定に維持される三者間のシヤトルベクターとなり得るプラスミドを作製することを試み、成功したものである。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的を達成するため、本発明によれば、キャンディダ マルトーサの自己複製配列とサツカロマイセス セレビジエ由来の Leu 2 遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子を含んで成るプラスミドが提供される。

さらに本発明によれば、下記 (a) ~ (c) の工程を含むプラスミドの製造方法が提供される。

- (a) サツカロマイセス セレビジエのベクター YEp 13 (Leu 2 遺伝子を含む) を用いてキャンディダ マルトーサのジーンライブラリーを作製する。
- (b) 次に、該ジーンライブラリーをロイシン要求性キャンディダ マルトーサを宿主として形質転換する。
- (c) 得られた形質転換体からプラスミドを分離して大腸菌に形質転換し、アンピシリン耐性

ン (Ap) 耐性、テトラサイクリン (Tc) 感受性となつたものを選択し、これより各々プラスミド DNA を分離しジーンライブラリーとした。

次に該ジーンライブラリーをロイシン要求性のキャンディダ マルトーサ J 288 株を宿主としてヒンネン等のプロトプラスト法 (ヒンネン, ヒックス, フィンクの プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci.), 75, 1929 (1978)) を用いて形質転換させ、ロイシンを含まない最少培地 (下記の組成) 上で増殖させた。

酵母用アミノ酸不含窒素源 (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acid) (ダイフコ (Difco) 社製)	0.67%
グルコース	2%
ソルビトール	1.2M
寒天	2%

得られた形質転換体よりプラスミド DNA を分離し、大腸菌に形質転換を行い、Ap 耐性となつたコロニーを選択し、これより新規なプラスミド

(pCS I と称する) を分離する。

なお、このプラスミド pCS I から、さらにこれより小さくて、なおかつ pCS I と同様の性質、機能を有するプラスミド (pCS 2 I と称する) を作製することができる。すなわち、プラスミド pCS I を制限酵素 Bam H I にて切断し、3.5 Kb の画分を分離し (T R A 領域) これを、ベクター YEp 13 を制限酵素 Bam H I にて切断した部位に挿入し pCS 2 I を作成した。

本プラスミド pCS 2 I は pCS I と同様キャンディダ マルトーサ及びサツカロマイセス セレビジエに形質転換を行うことが可能である。

(実施例 2)

次に本発明を実施例により更に詳細に説明する。

(実施例 1)

#### 新規プラスミド pCS I の作製

キャンディダ マルトーサ野生株 (IAM12247) を YEPD 培地 (組成: 酵母エキス 1%, ペプトン 2%, グルコース 2%) にて 30℃、48 時間培養後、これより全 DNA を抽出後、制限酵素 Sau

大腸菌 MC1061 株に形質転換させ、Ap 耐性となつたコロニーを分離した。この菌体より調製したプラスミド DNA を分離し、これを pCS I と称した。

(実施例 2)

#### プラスミド pCS I のキャンディダ マルトーサ及びサツカロマイセス セレビジエにおける発現

プラスミド pCS I をキャンディダ マルトーサ及びサツカロマイセス セレビジエにヒンネンらのプロトプラスト法を用いて形質転換を行つたところ DNA 1 µg 当り各々 330 個及び 1,650 個の形質転換体を得られた。又、伊藤等のリチウム金膜法 (伊藤, 福田, 村田, 木村のジャーナル オブ バクテリオロジー (Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A., *J. Bacteriol.* 153, 165 (1983)) を用いてキャンディダ マルトーサの形質転換を行つたところ DNA 1 µg 当り 280 個の形質転換体を得られ、極めて有力な方法であることが判つた。

(実施例 3)

3 A I で部分切断、一方サツカロマイセス セレビジエのベクター YEp 13 (Leu 2 を含む) を制限酵素 Bam H I で切断した。次に双方の DNA を T4DNA 連結酵素を用いて連結反応させた後、大腸菌 MC1061 株に形質転換させ Ap (50 µg/ml) を含んだ培地 (LB 培地: トリプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, NaCl 1%, pH 7.5) で 12 時間培養した。

生じた Ap 耐性コロニーのうちテトラサイクリン (Tc) 感受性となつたコロニーを 2000 個得た。これらのコロニーからプラスミドを分離し、キャンディダ マルトーサのジーンライブラリーとした。

一方、キャンディダ マルトーサ J 288 株 (ロイシン要求性株) を宿主としてヒンネン (Hinnen) らのプロトプラスト法を用いて、ジーンライブラリーで形質転換させ、ロイシン欠失培地にて再生を行つた。30℃で 4~5 日間培養後、生育してくるコロニーを分離し、ロイシン欠失液体培地で培養後、DNA を菌体から分離し、再度

#### pCS I の制限酵素地図の作成

制限酵素 EcoR I, Pst I, Hind III, BamH I 及び Sal I を用いてプラスミド pCS I を切断して、その断片の大きさから、それぞれの切断部位の相対位置を決定した。それを第 1 図に示す。このうち 1 はキャンディダ マルトーサ由来 DNA 断片 (6.3 Kb) を示す。

(実施例 4)

#### プラスミド pCS 2 I のキャンディダ マルトーサ及びサツカロマイセス セレビジエにおける発現

プラスミド pCS 2 I をキャンディダ マルトーサ及びサツカロマイセス セレビジエにヒンネンらのプロトプラスト法を用いて形質転換を行つたところ DNA 1 µg 当り各々 370 個及び 1,320 個の形質転換体を得られた。又、伊藤等のリチウム金膜法 (伊藤, 福田, 村田, 木村のジャーナル オブ バクテリオロジー (Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A., *J. Bacteriol.* 153, 165 (1983)) を用いてキャンディダ マルトーサの形質転換を行つたところ、DNA 1 µg 当り

60個の形質転換体を得られ、極めて有力な方法 案地図を示す。  
であることが判つた。

(実施例5)

pCS21の制限酵素地図の作成

制限酵素  $EcoRI$ 、 $PstI$ 、 $HindIII$ 、 $BamHI$  及び  $SacI$  を用いて、プラスミド  $pCS21$  を切断し、その断片の大きさから、それぞれの切断部位の相対位置を決定した。これを第2図に示す。このうち、2はキャンディダ マルトーサ由来のDNA断片(3.4KbのTRA領域)を示す。

[発明の効果]

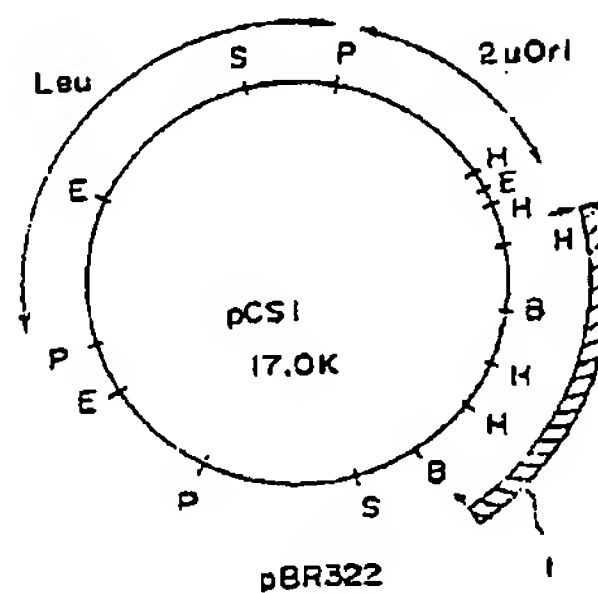
以上説明したように、本発明のプラスミドによれば大腸菌とサッカロマイセス セレビジエおよびキャンディダ マルトーサの細胞内においても複製が可能でかつ安定に維持されるシヤトルベクターとして利用することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のプラスミド  $pCS1$  の制限酵素地図を示す。

第2図は本発明のプラスミド  $pCS21$  の制限酵

第1図



E :  $EcoRI$  切断部位  
P :  $PstI$  切断部位  
H :  $HindIII$  切断部位  
B :  $BamHI$  切断部位  
S :  $SacI$  切断部位

第2図

